



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CFM-CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
ESTÁGIO SUPERVISIONADO II (QMC 5512)



Preparação de ésteres de aroma catalisada por lipases imobilizadas em filme de amido de batata

Carlos Geovanni Alves Ledra

Florianópolis, novembro de 2009

Carlos Geovanni Alves Ledra

**Preparação de ésteres de aroma catalisada por lipases imobilizadas
em filme de amido de batata**

Relatório apresentado ao Departamento de Química
da Universidade Federal de Santa Catarina,
como requisito parcial da disciplina de
Estágio Supervisionado II (QMC 5512)

Orientadora: Maria da Graça Nascimento

Florianópolis

11/2009

Carlos Geovanni Alves Ledra

**Preparação de ésteres de aroma catalisada por lipases imobilizadas
em filme de amido de batata**

Profa. Dra. Inês Maria Costa Brighente
Coordenadora de Estágios do Curso de Química-Bacharelado

Banca Examinadora:

Prof. Dra. Maria da Graça Nascimento
Orientadora

Prof. Dr. Hugo Alejandro Gallardo Olmedo

Prof. Dr. Santiago Francisco Yunes

Florianópolis
novembro/2009

Dedico e divido minhas conquistas até aqui com meus Pais, Cláudia e Carlos, agradeço a liberdade que eles me permitem usufruir e a confiança.

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos vão a todos que de alguma forma contribuíram para minha formação. Principalmente as pessoas especiais que contribuíram com meu crescimento pessoal.

- ✓ A Universidade Federal de Santa Catarina, pelo espaço físico fornecido.
- ✓ Ao CNPq e CAPES, pelo suporte e apoio financeiro.
- ✓ A Amano e a Novozymes, pela doação das enzimas.
- ✓ A Central de Análises, pelas várias análises realizadas.
- ✓ A minha orientadora, Profa. Dra. Maria da Graça Nascimento por toda dedicação, muita paciência, disposição e confiança depositada em mim e a co-orientadora, Dra. Elisa H. Moecke.
- ✓ Aos professores do Departamento de Química que contribuíram para esta conquista.
- ✓ Aos amigos do laboratório de Biocatálise Isa, Cris, Vanessa, Zana, Damianni, Thiago, Camila, Simone por tantas coisas ensinadas e toda a amizade.
- ✓ Ao Daniel, sempre presente e disposto a ajudar, realmente um amigo especial.
- ✓ A amigos especiais com os quais dividi muita coisa importante, em particular nos últimos tempos, Deonildo e Vivi.
- ✓ A tantos outros amigos que ficaram marcados, entre eles Latino, Vicente, Maressa, Brunno, Gigi, Leko, Evertato e Panterinha.
- ✓ Aos amigos do Circufsc, pela diversão e alegria.
- ✓ Aos meus pais, Claudia e Carlos, essa conquista é parte de vocês.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE GERAL	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
ÍNDICE DE TABELAS.....	IX
RESUMO.....	X
1- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	1
1.1- ENZIMAS	1
1.2- CLASSIFICAÇÃO DAS ENZIMAS.....	2
1.3 - LIPASES	3
1.4 - IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS.....	4
1.5 - AMIDO.....	7
1.6 - ÉSTERES DE AROMA	8
2 - OBJETIVOS	10
2.1 - OBJETIVO GERAL	10
2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
3 - MATERIAIS E MÉTODOS EXPERIMENTAIS.....	12
3.1- REAGENTES, SOLVENTES E ENZIMAS.....	12
3.2- EQUIPAMENTOS	13
3.3 - EXTRAÇÃO DO AMIDO DE BATATA	13
3.4 - PREPARAÇÃO DO FILME DE AMIDO E IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE	14
3.5 - PREPARAÇÃO DO MEIO REACIONAL PARA AS REAÇÕES DE TRANSESTERIFICAÇÃO E ESTERIFICAÇÃO	15
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
4.1 - CARACTERIZAÇÃO DOS GRÃOS DE AMIDO DE BATATA AIPO	18
4.2 - DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁGUA	19
4.3 - EFEITO DO SOLVENTE ORGÂNICO NOS FILMES DE AMIDO	20
4.4 - EFEITO DA TEMPERATURA NO FILME DE AMIDO	20
4.5 – REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO E ESTERIFICAÇÃO	20
4.5.1 - <i>Efeito da temperatura na conversão em acetato de cinamoíla</i>	21
4.5.2 - <i>Efeito da imobilização na síntese do acetato de cinamoíla</i>	22
4.5.3 - <i>Efeito da massa de lipase</i>	22

4.5.4 - Efeito do tamanho da cadeia alquílica na reação de esterificação para obtenção de alcenoatos de cinamoíla.....	23
4.5.5 - Reutilização do filme LPS/amido.....	25
4.5.6 - Efeito da influência do solvente orgânico	26
4.5.7 - Efeito da imobilização de diversas lipases em filme de amido de batata na obtenção do acetato de cinamoíla.....	27
4.5.8 - Efeito da concentração do doador acila	28
4.5.9 - Efeito da imobilização simultânea de duas lipases.....	29
4.5.10 - Análises espectroscópicas de IV e RMN- ¹ H do acetato de cinamoíla.....	30
5 - CONCLUSÕES	33
6 - PERSPECTIVAS	35
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Representações gráficas da estrutura tridimensional de uma enzima	1
Figura 2 - Representação esquemática do mecanismo de ação enzimática.	3
Figura 3 - Principais métodos de imobilização de enzimas.	6
Figura 4 - Exemplos de tubérculos e grãos fornecedores de amido.	1
Figura 5 - Estrutura da amilose e da amilopectina.	7
Figura 6 - Exemplos de ésteres de aroma obtidos <i>via</i> enzimática	9
Figura 7 - Extração do amido de batata aipo.....	14
Figura 8 - Preparação do filme de amido de batata e imobilização de lipases.....	15
Figura 9 - Preparação do meio reacional e análise do produto	16
Figura 10 - Espectro de RMN- H^1 de uma alíquota da reação de acetilação do álcool cinâmico.	17
Figura 11 - Micrografia dos grãos de amido de batata aipo (<i>Arracacia xanthorrhiz</i>) com solução glicerinada 2%.....	18
Figura 12 - Conversão em acetato de cinamoíla em função da massa de LPS imobilizada em filmes de amido	23
Figura 13 - Conversão dos alcenoatos de cinamoíla em função do tamanho da cadeia aquílica dos doadores acilas, utilizando o sistema LPS/batata.....	24
Figura 14 - Conversão em alcenoatos de cinamoíla em função da reutilização dos filmes após 30 dias, utilizando como catalisador o sistema LPS/batata.....	25
Figura 15 - Espectro de RMN- H^1 do acetato de cinamoíla.....	31
Figura 16 - Espectro de IV do acetato de cinamoíla.....	32

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação das enzimas de acordo com a UIBBM	2
Tabela 2 - Determinação do teor de água nos filmes de amido batata aipo.	19
Tabela 3 - Variação da conversão em acetato de cinamoíla em função da temperatura	21
Tabela 4 - Efeito da imobilização na conversão em acetato de cinamoíla	22
Tabela 5 - Efeito do solvente orgânico na conversão em acetato de cinamoíla, catalisado pelo sistema LPS/amido de batata.....	26
Tabela 6 - Conversão em acetato de cinamoíla utilizando diferentes lipases	27
Tabela 7 - Efeito da concentração de acetato de vinila na obtenção do acetato de cinamoíla.....	28
Tabela 8 - Efeito da utilização do “coquetel enzimático” LPS/LAK na conversão em acetato de cinamoíla	29
Tabela 9 - Efeito da utilização do “coquetel enzimático” LPS/LCR na conversão em acetato de cinamoíla	30

RESUMO

Enzimas são catalisadores protéicos que em condições ótimas de temperatura e pH aceleram as reações químicas. Estes biocatalisadores podem ter seu uso comprometido pela possibilidade da perda da ação catalítica, resultado da desnaturação da enzima. Este problema pode ser contornado com a utilização de métodos de imobilização.

Neste trabalho, foram imobilizadas as lipases M (LM), AK Amano 20 (LAK20), PS Amano SD, PS Amano IM, *Cândida rugosa* (LCR) e a lipase de *Pseudomonas* sp. (LPS) em filme de amido de batata para serem usadas como catalisadores nas reações de transesterificação e esterificação. Os reagentes utilizados foram o álcool cinâmico, acetato de vinila, bem como os ácidos propiônico, hexanóico, cáprico, láurico, mirístico, palmítico e esteárico. As reações foram realizadas em condições equimolares, exceto no estudo da concentração do doador acila, de 5 mmol de cada reagente, em diferentes solventes a 25°, 35° e 45° C.

Os parâmetros avaliados foram; teor de água, composição ideal do filme de amido e estabilidade do filme em diferentes solventes e elevadas temperaturas. Foram avaliados os efeitos da influência da imobilização, temperatura e tamanho da cadeia alquílica do ácido, reutilização do filme, procedência da lipase e massa de lipase. Foi também estudado a imobilização simultânea de lipases no mesmo suporte, variação da concentração do doador acila, bem como o do solvente orgânico na obtenção dos alcanos de cinamoíla.

As conversões em alcanos de cinamoíla foram dependentes do tamanho da cadeia alquílica do ácido, temperatura e concentração do acetato de vinila. A maior foi obtida na esterificação do ácido láurico a 35°C, sendo de 89%. As conversões em acetato de cinamoíla apresentaram resultados de moderados a bons, variando de 4,0-75,8% utilizando as lipases de diferentes procedências imobilizadas em filme de amido. Com o sistema LPS/batata, o acetato de cinamoíla foi obtido com conversões de 39-83,3% na presença de acetonitrila, CCl₄, 1,4-dioxano, CH₂Cl₂, CHCl₃, *t*-butanol e MTBE. Utilizando duas lipases imobilizadas simultaneamente, LPS/LCR ou LPS/LAK as conversões foram moderadas variando entre 9,0 – 48,2%.

Os resultados obtidos mostram a viabilidade do uso de filme de amido de batata aipo como suporte para imobilização de lipases com aplicações na síntese de ésteres de aroma, em condições suaves de reação.

Palavras Chaves: transesterificação, esterificação, lipases, imobilização, amido.

1- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1- Enzimas

Enzimas são, em geral, catalisadores de origem protéica que atuam em uma série de reações biológicas que ocorrem em organismos vivos, em condições favoráveis de temperatura e pH, aumentando de forma considerável a velocidade das reações. Elas são formadas por uma longa cadeia de aminoácidos ligados através de ligações peptídicas, e a seqüência exata de aminoácidos da cadeia protéica é denominada de estrutura primária. A conformação tridimensional é chamada de estrutura secundária (**Figuras 1a e 1b**), e a disposição espacial da seqüência é denominada de estrutura terciária (**Figura 1c**).^{1,2,3}

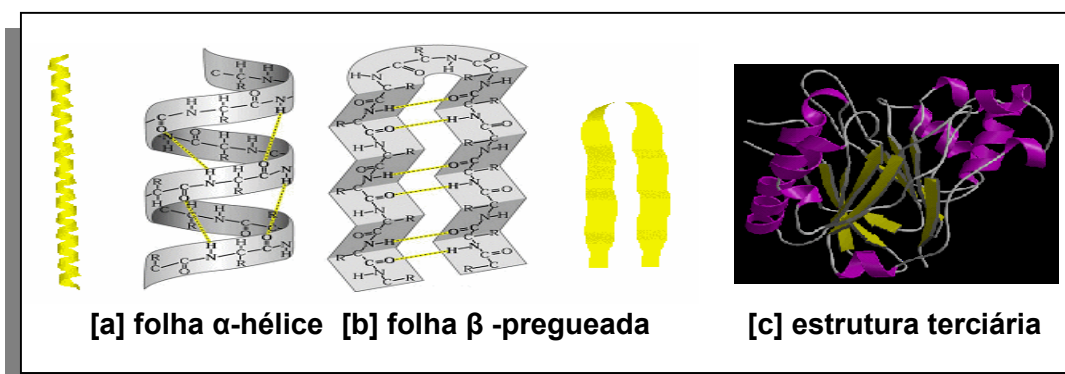


Figura 1 - Representações gráficas da estrutura tridimensional de uma enzima

As enzimas contêm um sítio ativo, o qual constitui somente uma pequena porção de seu volume total e que está usualmente próximo ou na superfície, estando assim acessível às moléculas de substratos. O sítio ativo contém aminoácidos cujas cadeias laterais formam uma superfície tridimensional complementar ao substrato.²⁻⁴

As enzimas possuem atividade catalítica, diferente de outras proteínas. Com a sua presença e sem serem consumidas, elas aumentam a velocidade dos processos químicos, que de outra forma ocorreriam muito lentamente. As enzimas são muito específicas pela conformação e composição química do sítio ativo, isto é, cada uma poderá hidrolisar ou sintetizar um composto em particular. Por apresentar tais propriedades, elas têm sido amplamente utilizadas em síntese orgânica.⁵⁻⁷

1.2- Classificação das enzimas

A União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (UIBBM) divide as enzimas em seis grupos, e cada uma dessas dividem-se em sub-grupos de acordo com o tipo de reação catalisada. Entretanto, a aplicação em química orgânica se restringe a cinco grupos, sendo que as enzimas hidrolíticas são as mais utilizadas por não requererem cofatores.^{2,4,5,8}

Tabela 1 - Classificação das enzimas de acordo com a UIBBM

Número	Classe	Tipo de reação catalisada	Subclasse
1	Oxirredutases	Transferência de elétrons ou remoção de hidrogênio	Hidrogenases, oxidases, peroxidases.
2	Tranferases	Reações de transferência de grupos	Transaldolases, transcetolases.
3	Hidrolases	Reações de hidrólise	Esterases, lipases , peptidases, fosfatases.
4	Liases	Reações de adição de grupos a dupla ligação ou formação de duplas ligações por remoção de grupos	Descarboxilases, cetoácidas, hidrolase.
5	Isomerases	Transferência de grupos dentro da molécula para produzir isômeros	Racemases, epimerases, oxirredutases, mutase.
6	Ligases	Formação e clivagem de ligações C-C, C-S, C-O e C-N e ésteres de fosfato	

Estes catalisadores são altamente eficientes, aumentando a velocidade das reações na ordem de 10^6 a 10^{23} vezes, que as mesmas não catalisadas. A função de um catalisador é diminuir a energia de ativação (E_a) entre os reagentes e produtos. Esta habilidade ocorre devido à capacidade de aproximar os substratos em uma orientação tal que favorece a formação do complexo enzima-substrato (ES), para posteriormente formar os produtos (**Figura 2**).^{5,6,8}

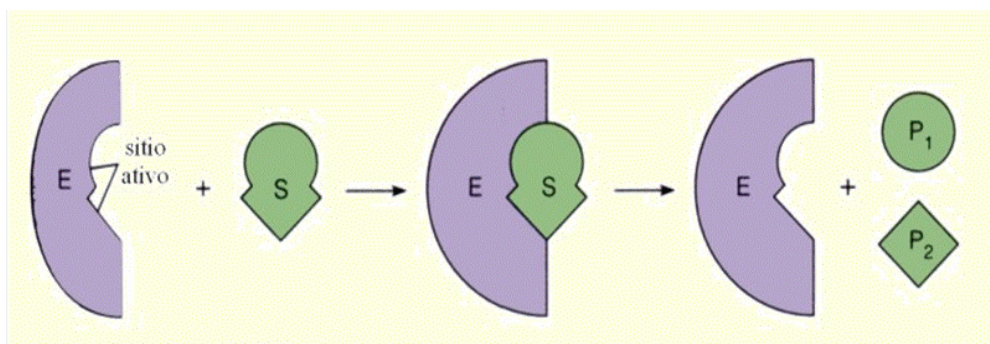


Figura 2 - Representação esquemática do mecanismo de ação enzimática.⁸

A formação do complexo enzima-substrato (ES) depende das chances de ocorrer choques eficazes entre o sítio ativo e o substrato.^{6,8}

As enzimas hidrolíticas (proteases, celulasas, amilases e lipases) são as mais usadas na química orgânica. Entre as várias razões que as tornam uma opção particularmente atrativa, pode-se citar a alta estabilidade e atividade com relação a vários substratos, são de baixo custo, atuam em condições suaves de sínteses e, em geral, não necessitam de co-fatores.^{5,9,10}

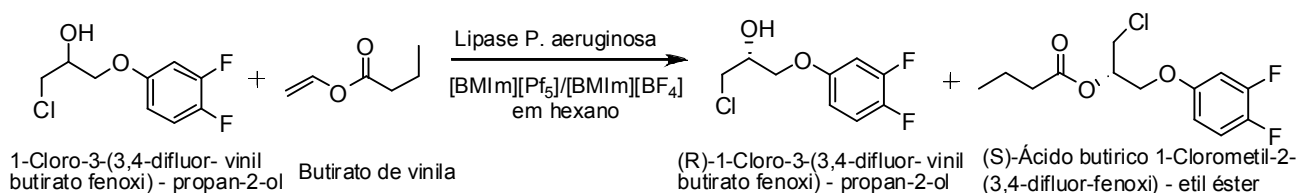
1.3 - Lipases

As lipases são enzimas hidrolíticas de origem animal (pancreática, hepática e gástrica), microbiana (fungos e bactérias) e vegetal, com diferentes propriedades catalíticas. São, em sua maioria, extracelulares, favorecendo a extração, isolamento e purificação.⁹⁻¹² Podem ser facilmente obtidas através da fermentação de microorganismos, tais como os fungos *Aspergillus mucor*, *Rhizopus penicillium*, de leveduras *Tulopsis* sp e *Candida* sp e também de bactérias tais como as de *Pseudomonas* sp e *Staphylococcus* sp.¹³

Em seu ambiente natural estas enzimas possuem a função de catalisar a hidrólise de triacilgliceróis aos correspondentes ácidos graxos e glicerol. Além das funções metabólicas, as lipases possuem um papel importante em biotecnologia principalmente na indústria de óleos e de alimentos, como no desenvolvimento de aromas, de detergentes, na hidrólise de óleos e gorduras, na síntese de biosurfactantes, manutenção de queijos, na produção de bebidas alcoólicas, para tratamento de resíduos oleosos oriundos da indústria de couro e de papel.¹⁴⁻¹⁷

Além das aplicações citadas acima, lipases de diversas fontes, principalmente oriundas de *Candida antarctica* e *Thermomyces lanuginosus* tem sido usadas na produção de biodiesel.¹⁸

Singh e col.¹⁹ utilizaram a lipase de *Pseudomonas aeruginosa*, em hexano juntamente com líquidos iônicos, na síntese de fármacos enantiomericamente enriquecidos. Foi obtido um intermediário do Lubeluzole, que é um fármaco indicado para tratamentos de acidentes vasculares cerebrais (AVC). (**Esquema 1**).



Esq 1.

Porém existem algumas desvantagens relacionadas com a utilização de enzimas como catalisadores, em especial em meio orgânico.^{5,20}

- ✓ Não possuem estabilidade suficiente em condições reacionais, podendo perder a atividade catalítica quando submetidas a altas temperaturas, além da auto-oxidação, autodigestão e/ou desnaturação pelo solvente.
- ✓ Podem sofrer inibição por agentes químicos e/ou físicos (exs. temperatura, pH do meio e solvente).
- ✓ Ainda tem um custo alto relacionado ao processo de produção e purificação.

Para aplicações específicas de lipases em sínteses e biotransformações, às vezes, é necessário que o biocatalisador esteja imobilizado. A imobilização pode melhorar a estabilidade, atividade e permite a reutilização.^{21,22}

1.4 - Imobilização de enzimas

Os métodos de imobilização de enzimas são processos que oferecem vantagens considerando que em geral, aumentam a estabilidade do biocatalisador e são economicamente viáveis. A técnica de imobilização consiste no confinamento de

enzimas ou microorganismos em uma região restrita (suporte ou biorreator), conferindo aos mesmos uma maior resistência à temperatura, solventes de baixa polaridade, pH, etc. O biocatalisador imobilizado pode ser facilmente recuperado e reutilizado, proporcionando, algumas vezes, um aumento da atividade enzimática.^{1,23-26}

As interações entre os biocatalisadores e os suportes utilizados são muito importantes, pois estas podem influenciar diretamente na estabilidade e nos efeitos cinéticos da catálise. A escolha da matriz é fundamental para uma boa atuação do sistema com a enzima imobilizada. As características desejáveis para um bom suporte são a área superficial grande, boa permeabilidade, características hidrofílicas, estabilidade química, mecânica e térmica, alta rigidez, forma e tamanhos adequados, resistência ao ataque de microorganismos e capacidade de reutilização.²³⁻²⁶

Diferentes métodos têm sido usados na imobilização de enzimas e estão divididos em três categorias, ligação em suporte: adsorção física, ligação iônica, ligação covalente, método de confinamento; em fibras, cápsulas e em gel como mostrado na **Figura 3**.

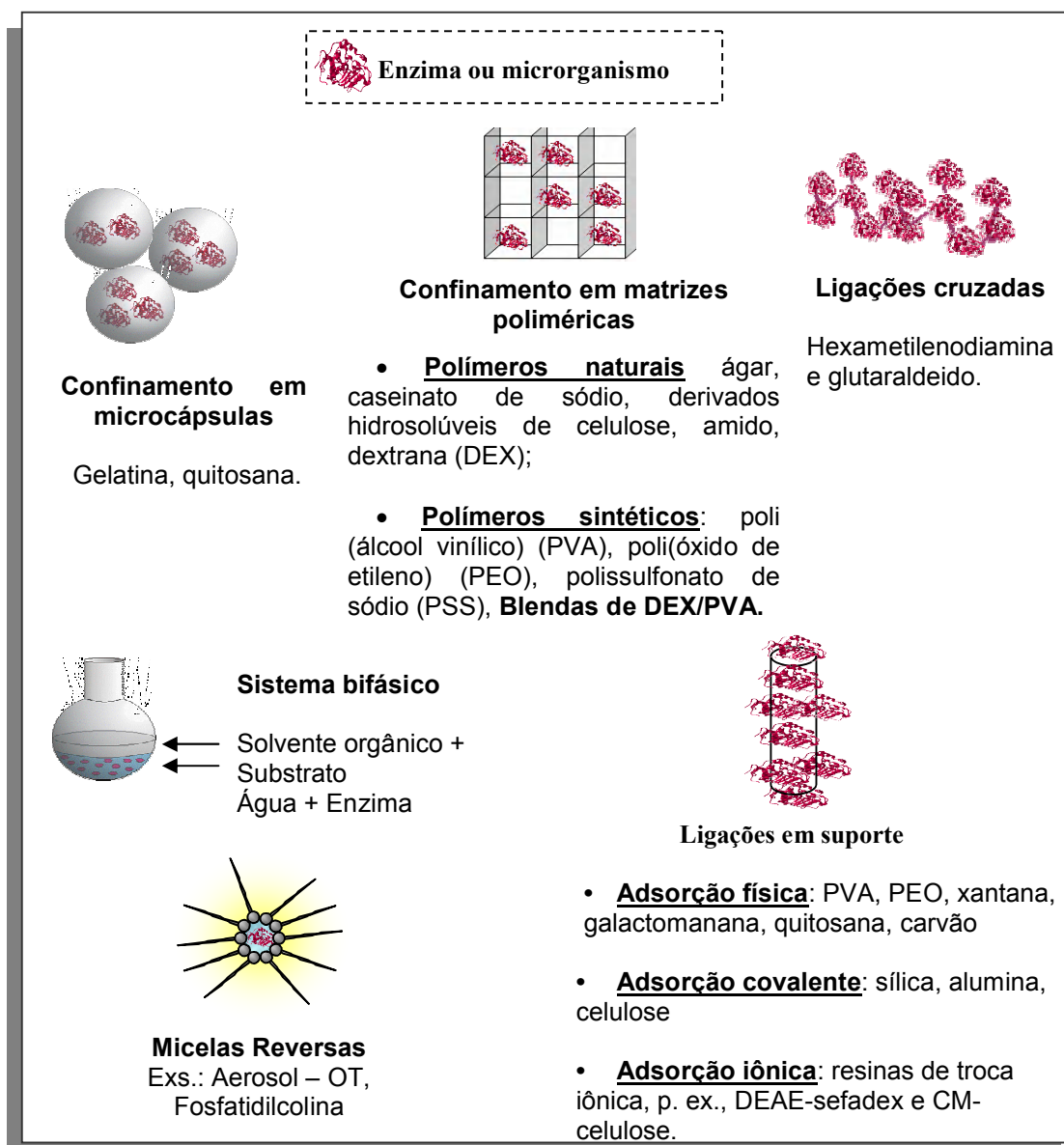


Figura 3 - Principais métodos de imobilização de enzimas. (adaptado da ref.5)

A utilização de filmes produzidos a partir de proteínas ou polissacarídeos tem contribuído para que haja um aumento da biocompatibilidade entre suporte e biocatalisador, criando um micro-ambiente favorável, e beneficiando desta forma a atividade enzimática. Dentre as vantagens de utilizar estes biofilmes como suportes para biocatalisadores em síntese orgânica, destacam-se suas boas propriedades mecânicas, resistência a solvente de baixa polaridade, hidrofiliicidade, atoxicidade, e o fato de serem biodegradáveis e de baixo custo. A escolha do suporte é baseada em função das propriedades desejadas e do biopolímero selecionado. Além disso, por serem biodegradáveis e solúveis em água, estes suportes tornam os processos

econômicos e ambientalmente favoráveis, preenchendo desta forma os requisitos necessários para o desenvolvimento de uma “química limpa”.^{26,27}

1.5 - Amido

O amido constitui a mais importante reserva de nutrientes de todas as plantas superiores ocorrendo principalmente em sementes, tubérculos, rizomas e bulbos. Ocorre também em algas e, pelo fato de ser hidrolisado e digerido é um dos insumos mais importantes na alimentação do homem e dos animais.^{28,29}

Na **Figura 4**, são mostrados alguns tubérculos e grãos comuns no Brasil, e que são fontes de amido.³⁰⁻³⁶

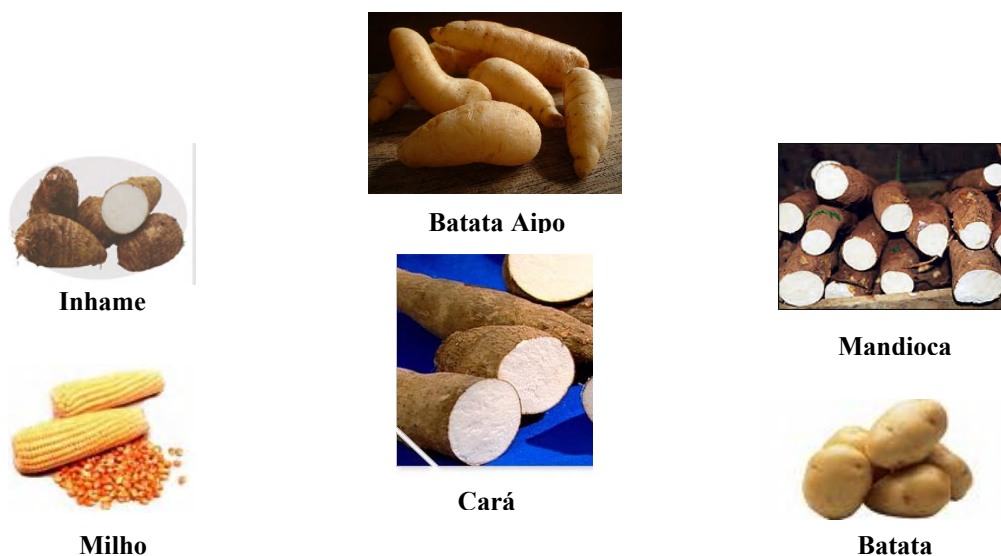


Figura 4 - Exemplos de tubérculos e grãos fornecedores de amido.

O amido é constituído por uma mistura de dois polissacarídeos, amilose e amilopectina, **Figura 5**, em proporções variadas dependendo da procedência da espécie vegetal. As proporções de amilose e amilopectina variam também de acordo com o grau de maturação das plantas, e influenciam na viscosidade e poder de gelificação do amido.^{27,28}

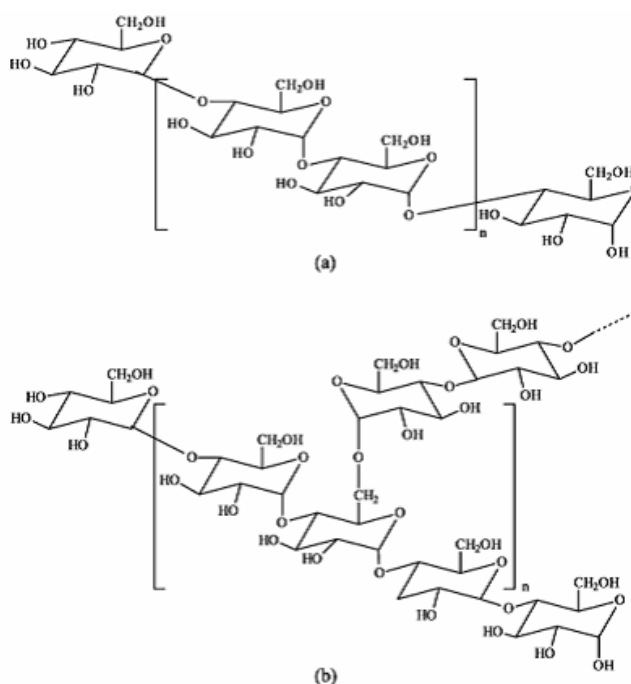


Figura 5 - Estrutura da amilose (a) e da amilopectina (b).³

O uso do amido no Brasil ocorre, principalmente, em indústrias alimentícias além de metalúrgica, mineração, construção, cosmética, farmacêutica, papel e papelão, têxtil, entre outras.³⁷

A mistura de amido com polióis (glicerol e/ou sorbitol) forma uma massa amorfa que pode ser transformada em filmes, estes totalmente biodegradáveis, sendo que não é utilizado nenhum polímero sintético em sua fabricação. O uso destes polióis é indispensável por fornecer ao filme maleabilidade, pois serve de lubrificante interno para moléculas de amido e previne a retrogradação.^{38,39}

1.6 - Ésteres de Aroma

Os ésteres de aromas são ingredientes importantes para a obtenção de vários produtos na indústria de alimentos, e são encontrados em muitos óleos essenciais. São geralmente usados como compostos de sabor e fragrâncias em alimentos e bebidas, gerando aromas de produtos naturais e frutos.⁴⁰⁻⁴³

Ésteres de aroma derivados do álcool cinâmico constituem uma classe que possui uma vasta aplicação nas indústrias alimentícias, farmacêuticas e de cosméticos por possuírem essência de perfumes e flavorizantes.⁴¹

Estes produtos podem ser obtidos por métodos químicos que utilizam catalisadores mais agressivos. Porém, metodologias mais recentes apresentadas nas últimas duas décadas mostram que a reação de esterificação *via* enzimática utilizando principalmente lipases que podem ser usadas em solventes orgânicos, mostra-se cada vez mais promissora na síntese de ésteres de aroma.^{40,42,43}

A **Figura 6** mostra alguns exemplos de ésteres de aroma que vem sendo obtidos *via* catálise enzimática, com lipases.^{21,40-42,44}

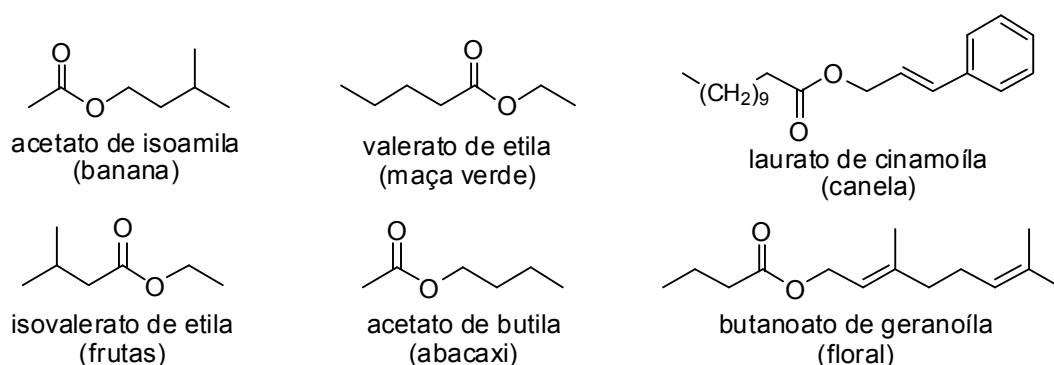


Figura 6 - Exemplos de ésteres de aroma obtidos via enzimática

Bezbradica e *col.* utilizaram as lipases pancreática do porco e de *Rhizomucor miehei* na reação de obtenção de diversos ésteres de aroma, entre eles o butanoato de geranoíla e octanoato de heptila.⁴⁰ Dandavate e *col.* prepararam o *iso*-valerato de etila usando como catalisador a lipase de *Candida rugosa* imobilizada em nanopartículas de sílica.²¹

2 - OBJETIVOS

2.1 - Objetivo geral

Utilizar filme de amido de batata como suporte para a imobilização de lipases, e utilizar estes sistemas como catalisadores em reações de transesterificação ou esterificação em meio orgânico, para obtenção de alcenoatos de cinamoíla.

2.2 - Objetivos específicos

- Extrair, isolar, purificar e caracterizar o amido proveniente do tubérculo de batata aipo.
- Aperfeiçoar as condições experimentais para a preparação do filme de amido de batata, após a extração do tubérculo, avaliando a influência de plastificantes como o glicerol e/ou sorbitol.
- Avaliar a estabilidade do filme em função do solvente orgânico e temperatura e determinar o teor de água pelo método de titulação de Karl-Fischer.
- Imobilizar lipases de diversas fontes (lipase de *Pseudomonas* sp – LPS, de *Cândida rugosa* – LCR, Lipase AK 20, entre outras) no filme de amido de batata.
- Avaliar a influência da imobilização ou não do biocatalisador na reação de transesterificação do acetato de vinila com o álcool cinâmico, o efeito da imobilização simultânea de duas lipases e da concentração do doador acila.
- Avaliar o efeito da variação da massa de lipases e do solvente orgânico em reações de transesterificação do acetato de vinila com o álcool cinâmico ou na de esterificação deste álcool com ácidos carboxílicos alifáticos.
- Avaliar o efeito da temperatura nas reações de transesterificação e do tamanho da cadeia alquílica do ácido nas reações de esterificação.
- Avaliar a reutilização do suporte (lipase/ filme de amido) após a armazenagem em solvente orgânico nas reações citadas acima.

- Caracterizar e quantificar a conversão dos alcenoatos e acetato de cinamoíla por técnicas espectroscópicas de infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H), e cromatografia de camada delgada.
- Comparar os dados obtidos com outros reportados na literatura.
- Apresentar os resultados obtidos em congressos específicos da área de química.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS EXPERIMENTAIS

3.1- Reagentes, solventes e enzimas.

Os reagentes, que foram utilizados neste trabalho são:

- Amido de batata aipo (extraído de fontes vegetais);
- Álcoois: álcool cinâmico, (Riedel)
- Acetato de vinila, 98% (Fluka);
- Ácidos: propanoico (Vetec); hexanoico (Aldrich); cáprico (Fluka); láurico (Vetec); mirístico (Fluka); palmítico (Aldrich) e esteárico (Vetec).
- Enzimas:

lipase de *Burkholderia cepacia* - LPS (Amano, 30.000 u/g)*

lipase de *Mucor Javanicus* - LM (Amano, 10.000u/g)*

lipase de *Candida rugosa* - LCR (Sigma, 746u/mg)**;

lipase de *Pseudomonas fluorescens* - AK 20 (Amano, 25.000 u/g);

lipase de *Burkholderia cepacia* - PS SD (Amano, 30.000u/g);

lipase de *Burkholderia cepacia* - PS IM (Amano, 500u/g)

lipase de *Rhizopus oryzae* - LF-AP15 (Amano, 150.000 u/g)

lipase de *Aspergillus niger* - LA 12 (Amano, 120.000 u/g);

lipase de *Candida cylindracea* - AY 30 (Amano, 30.000 u/g);

*Uma unidade de atividade lipolítica esta definida como a quantidade de enzima a qual libera um μmol de ácidos graxos por minuto. Como substrato foi usado o óleo de oliva. **Uma unidade de atividade lipolítica hidrolisa 1 $\mu\text{equivalente}$ de acido graxo a partir do trigliceridio em 1h, pH 7,7, a 37 °C. ⁴⁵

- Sorbitol, 99,0% (Vetec);
- Glicerol, 99,5% (Vetec);
- Solventes: hexano (F. Maia); acetonitrila (Vetec); *t*-butanol (Vetec); tetracloreto de carbono (CCl_4) (Vetec); diclorometano (CH_2Cl_2) (Nuclear); éter *t*-butilmetílico (MTBE)(Tedia); 1,4-dioxano (Vetec); clorofórmio (CHCl_3) (Vetec); glicerol (Vetec); sorbitol (Vetec)
- Clorofórmio deuterado (CDCl_3) (Aldrich);
- Sílica gel DGF Riedel-deHaën máx. 400 mesh.

3.2- Equipamentos

Os equipamentos que foram utilizados neste trabalho são descritos a seguir:

- Espectrômetro de RMN¹H (Varian AC 400F, 400MHz);
- Espectrofotômetro de infravermelho (FTIR da Perkin Elmer 16C);
- Titulador 633 Automático Karl Fischer, Metrohm AG CH-9100 Herisau;

Estes equipamentos estão localizados na Central de Análises, e os seguintes disponíveis nos laboratórios 301/306, ambos do DQ – UFSC.

- Cromatógrafo a gás GC-14B Shimadzu;
- Agitador com banho termostaticado Technal TE-0532;
- Rota-evaporador Büchi 461
- Agitadores magnéticos;
- Chapas de aquecimentos.

Os equipamentos utilizados nas análises micrográficas estão localizados no Laboratório de Microscopia do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos - UFSC.

- Microscópio ótico Olympus BX 40;
- Câmera digital Media Cybernetics coolSNAP – PRO cf color.

3.3 - Extração do amido de batata

Esta etapa do trabalho foi realizada em colaboração com a Prof^a. Dra. Elisa H. Moecke, do Laboratório de Microscopia do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos - UFSC.

Cerca de 1,0 Kg de tubérculos de batata aipo foram selecionados para extração do amido. Os tubérculos foram lavados, descascados e posteriormente picados e colocados em um liquidificador comercial com aproximadamente 500 mL de água para cada 500g de tubérculo. A seguir, foram triturados, peneirados e lavados com água corrente, para que o amido desprendesse das fibras.

O filtrado contendo o amido foi deixado em repouso por ~48h para decantar. Após esse período, o sobrenadante foi descartado e o amido colocado na estufa a

50 °C por 24h para secagem. Na extração deste amido, e após purificação, obteve-se 117,5 g. As etapas descritas anteriormente estão apresentadas na **Figura 7**.

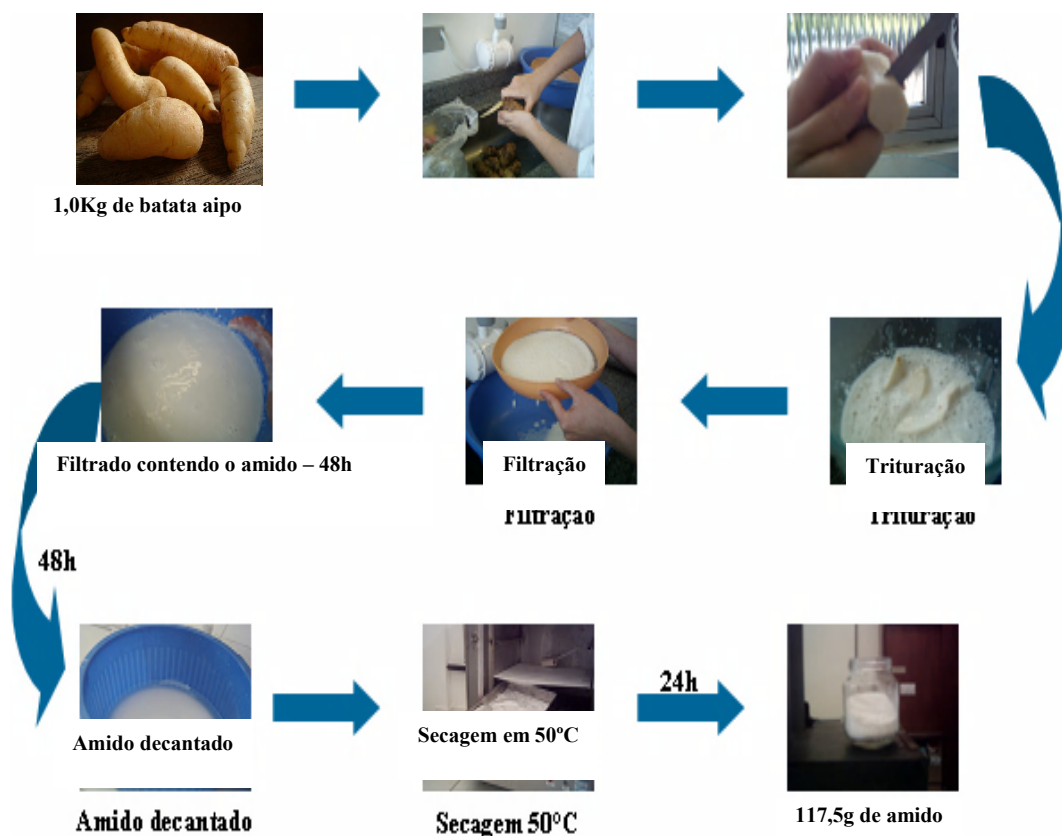


Figura 7 - Extração do amido de batata aipo

3.4 - Preparação do filme de amido e imobilização da lipase

O filme foi preparado seguindo-se a metodologia descrita a seguir: em um béquer de 50mL foi adicionado 0,5-1,5g de amido dissolvido em 25mL de água destilada com 0,2-0,5mL de glicerol e/ou 0,2-0,3g de sorbitol. A solução deve ser mantida sob agitação magnética e com aquecimento de ~ 45-55°C por 1h.

Foram feitos testes iniciais para a definição das condições que formaram o filme mais estável. O filme mais estável e maleável foi obtido com 1,0g de amido de batata aipo, 0,3g de sorbitol/glicerol em 25mL de água. O filme obtido com glicerol como plastificante, é um pouco menos maleável do que com sorbitol. Portanto, este

agente plastificante foi usado na preparação dos filmes sem e com as lipases imobilizadas.

Após os testes iniciais, foram preparados os filmes com as lipases, adicionando 0-100mg da enzima, e agitando o sistema por mais 20 min. A solução foi transferida para uma placa de Petri e colocada na capela ou aquecida em um banho de areia a $\sim 40^{\circ}\text{C}$ para evaporação da água, por $\sim 24\text{h}$.

O filme com as enzimas imobilizadas foram cortados em pequenos pedaços e transferidos para um erlenmeyer de 250mL contendo o solvente orgânico, para serem usados posteriormente nas reações biocatalisadas. **(Figura 8)**

Também foi preparado filme de amido de batata com glicerol e/ou sorbitol na ausência de lipases. Estes foram usados nos estudos de estabilidade em diversos solventes orgânicos e nos de termoestabilidade

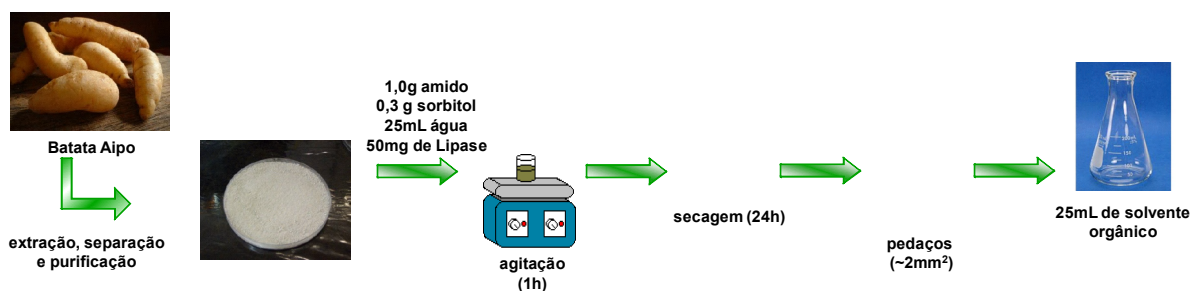
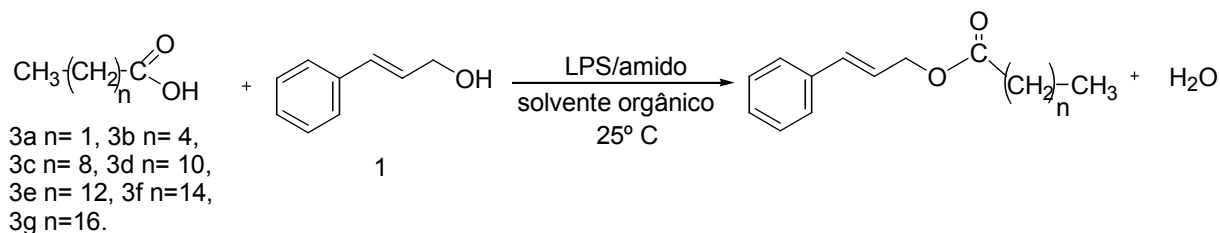
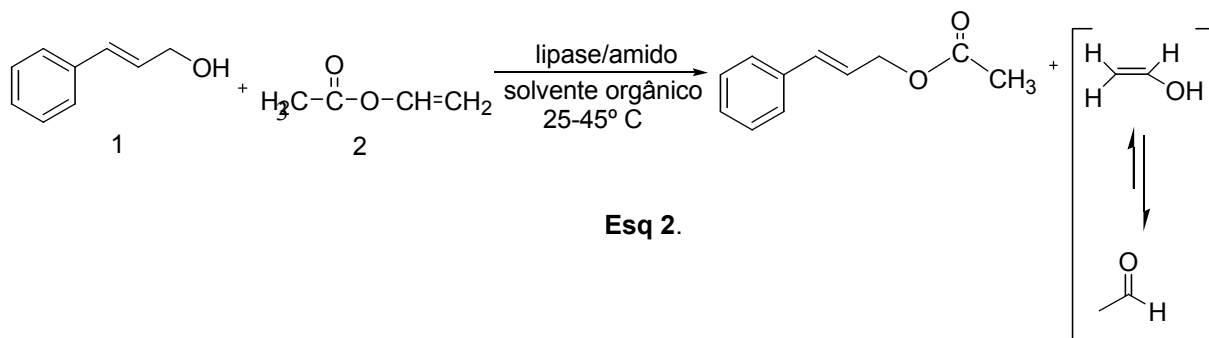


Figura 8 - Preparação do filme de amido de batata e imobilização de lipases

3.5- Preparação do meio reacional para as reações de transesterificação e esterificação

Para as reações de transesterificação e esterificação foram adicionados em um erlenmeyer de 250mL, o solvente orgânico (25 mL), álcool cinâmico (**1**) (5 mmol, 0,7 mL), acetato de vinila (**2**) (5 mmol, 0,5 mL) ou os outros agentes acilantes, ácidos carboxílicos alifáticos, (**3a-g**) (5 mmol) e as diversas lipases imobilizadas no filme de amido de batata aipo, conforme representado nos **Esquemas 2 e 3**.



A mistura reacional foi mantida em banho termostatzado com agitação orbital da Technal TE-0532 nas temperaturas de 25°C – 45 °C por um período de até 72h, ou até que a reação se completasse.

As reações foram monitoradas por cromatografia de camada delgada (ccd), usando como eluente proporções variadas de hexano e acetato de etila. Após o término, a mistura reacional foi transferida para um balão de fundo redondo e o filme de amido lavado com solvente orgânico por diversas vezes para assegurar que todos reagentes e o produtos fossem retirados do filme (acompanhando também por ccd). Posteriormente, o solvente foi evaporado no rota-evaporador, obtendo-se o produto desejado. **(Figura 9)**

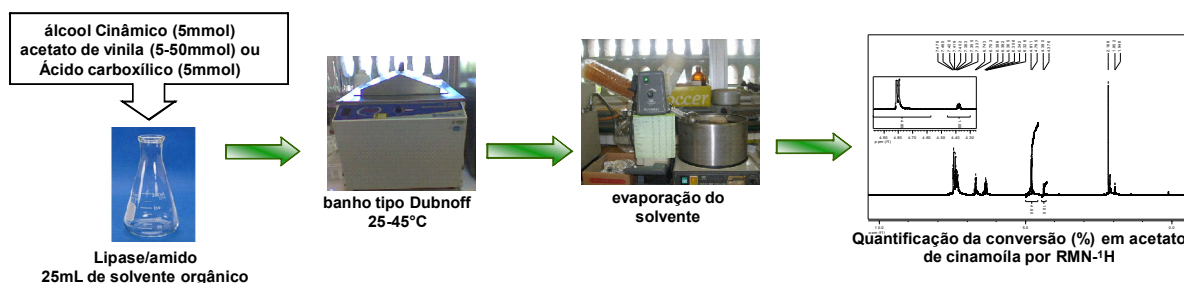


Figura 9 - Preparação do meio reacional e análise do produto

Após evaporação do solvente, a formação do produto foi quantificada por análises de ressonância magnética nuclear de hidrogênio - RMN-¹H. Para

determinação da conversão comparou-se os deslocamentos químicos dos hidrogênios metilênicos do álcool e do éster.

Por exemplo, na obtenção do acetato de cinamoila, a conversão foi determinada por comparação da integral dos dubletes dos hidrogênios metilênicos do álcool cinâmico (centrado em 4,38 ppm) com os do éster (centrado em 4,80 ppm).

A **Figura 10** mostra o espectro de RMN- ^1H de uma alíquota da reação de transesterificação do acetato de vinila com o álcool cinâmico usando como biocatalisador a LPS imobilizada, ressaltando-se a região dos hidrogênios metilênicos (conv. 83,0%).

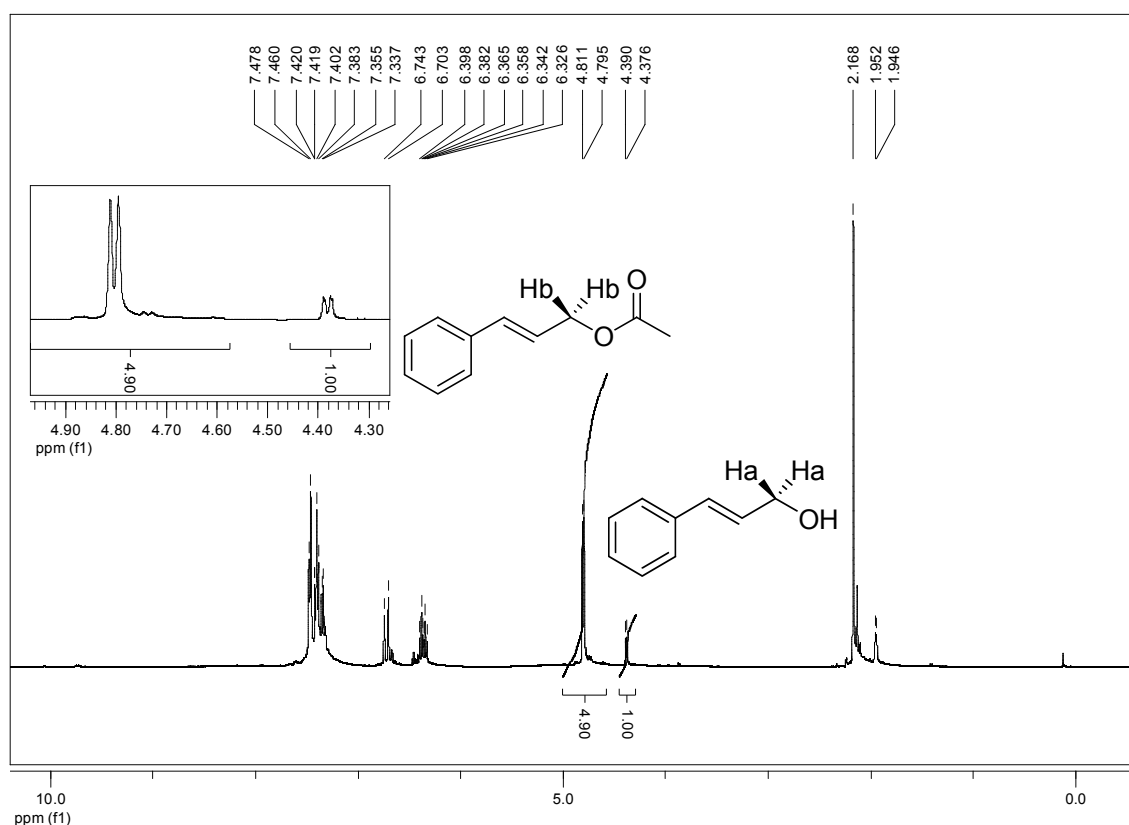


Figura 10 - Espectro de RMN- ^1H de uma alíquota da reação de acetilação do álcool cinâmico. A região expandida corresponde as integrais dos hidrogênios metilênicos do álcool (Ha) (4,38) e do éster (Hb) (4,80), conv. 83,0%. [LPS 50mg, acetonitrila, 35°C, 48h (400MHz, CDCl_3)]

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho imobilizaram-se lipases de diferentes procedências em filme de amido de batata aipo. Estes suportes foram utilizados em reações de esterificação e transesterificação, sendo que a quantificação e caracterização dos ésteres foram realizadas através de técnicas espectroscópicas de infravermelho (IV) e ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN- H^1). Para a obtenção do amido realizou-se a extração de fonte vegetal (batata aipo), e posteriormente foi feita a caracterização através de microscopia ótica. Os itens a seguir apresentam os resultados obtidos.

4.1 - Caracterização dos grãos de amido de batata aipo

Para a caracterização dos grãos de amido de batata aipo foi utilizada a análise microscópica, que também é útil para identificar as estruturas histológicas de vegetais, animais e outros materiais. A **Figura 11** mostra a micrografia dos grãos de amido de batata aipo.

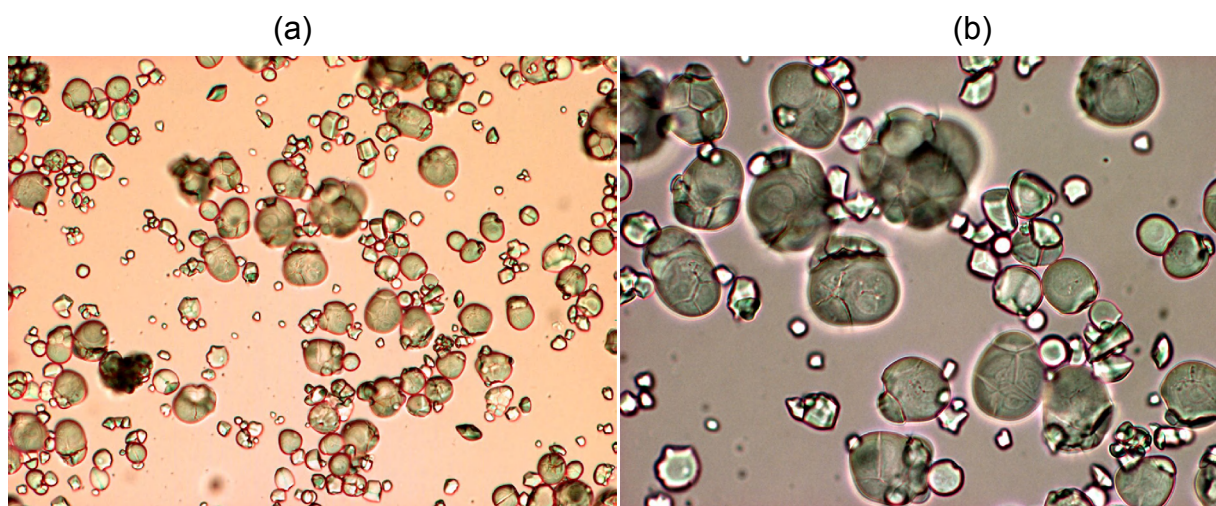


Figura 11 - Micrografia dos grãos de amido de batata aipo (*Arracacia xanthorrhiz*) com solução glicerizada 2%. (a) Aumento de 200X. (b) Aumento de 400X.

Analizando as **Figuras 11a e b**, observa-se que os grãos de amido não se apresentam agrupados. Os grãos têm tamanho pequeno variando entre 5 – 25 μm , sendo que os maiores possuem formato esférico ou irregularmente arredondado, enquanto os pequenos apresentam formato mais poligonal. O hilo nem sempre é

visível, mas os que apresentam são encontrados no centro do grão, sendo visíveis em alguns grãos lamelas ou estrias. As ampliações ainda mostram que o amido de batata aipo apresenta rachaduras nos grãos, e este fato pode ter ocorrido por ter sido usado temperaturas elevadas no processo de secagem

Os grãos de amido possuem formas típicas dependendo da espécie de origem. No caso do amido de batata aipo os grãos maiores são descritos de forma predominantemente circular, enquanto os pequenos mostram formato mais poliédrico e poligonal. O diâmetro médio dos grãos varia muito conforme a variedade plantada, idade e época de colheita, mas é relatada com valores entre 10 e 17,3 μ m.⁴⁶

4.2 - Determinação do teor de água

O teor de água no filme de amido de batata, utilizando sorbitol (S) como plastificante, foi determinado pelo método de titulação Karl-Fischer. Os filmes preparados com 50mg de LPS e sem a mesma, apresentaram de 2,43-3,26% de água. Estes valores estão mostrados na **Tabela 2**.

Tabela 2 - Determinação do teor de água nos filmes de amido batata aipo.	
sistemas	teor de água (%)
filme batata/S	2,74; 3,26
filme batata/ S/ LPS	3,02; 2,43

Os filmes, contendo ou não a LPS, apresentaram um baixo teor de água quando comparados a outros resultados, utilizando os filmes de amido de inhame e cará, que apresentaram teores de água de aproximadamente 12,0%.⁴⁷ Porém, esta informação é importante, pois já está documentado na literatura, que as enzimas necessitam de uma quantidade mínima de água para manter sua conformação tridimensional, a integridade estrutural do sítio ativo e conseqüentemente a atividade catalítica.^{5,13}

4.3 - Efeito do solvente orgânico nos filmes de amido

O filme de amido de batata aipo com sorbitol, sem lipase, foi submetido ao teste de estabilidade em solventes orgânicos. Os solventes utilizados foram o *n*-hexano, *n*-heptano, éter etílico, etanol, acetonitrila, clorofórmio, 1,4 dioxano, *t*-butanol, tetracloreto de carbono (CCl₄), diclorometano (CH₂Cl₂) e éter *t*-butil metílico (MTBE).

Para realização dos testes, o filme foi colocado em tubos de ensaio com aproximadamente 1 mL dos solventes citados acima, por 24h a temperatura ambiente. O filme de amido permaneceu estável, sem alterações macroscópicas. Portanto, estes foram classificados como aptos para os estudos posteriores nas reações de esterificação e transesterificação.

4.4 - Efeito da temperatura no filme de amido

Foi analisada a influência da temperatura no filme de amido de batata aipo com sorbitol, visando observar se ocorreria ou não decomposição deste em temperaturas mais elevadas. O filme foi aquecido em hexano, em banho-maria até 60°C, por aproximadamente 20-30 minutos, não havendo mudança no aspecto macroscópico do filme, sendo assim considerado resistente a temperaturas mais elevadas.

4.5 - Reação de transesterificação e esterificação

Conforme citado, neste trabalho foram estudadas as reações de transesterificação do acetato de vinila (2) com o álcool cinâmico (1) (**Esquema 2**, pág 16), bem como a reação de esterificação dos ácidos propiônico, hexanóico, cáprico, láurico, mirístico, palmítico e esteárico (3) com o álcool cinâmico (**Esquema 3**, pág 16). As reações foram realizadas utilizando-se lipases imobilizadas em filmes de amido de batata aipo como catalisadores da reação. As porcentagens de

conversão em acetato e alcenoatos de cinamoíla foram determinadas através da análise dos espectros de RMN-¹H (pág 17).

4.5.1 - Efeito da temperatura na conversão em acetato de cinamoíla

Para avaliar a influência da temperatura na porcentagem de conversão do álcool cinâmico em acetato de cinamoíla, a reação foi realizada em 25, 35 e 45°C, utilizando 50mg de LPS imobilizada em filme de amido de batata aipo. Os resultados obtidos se encontram na **Tabela 3**.

Tabela 3 - Variação da conversão em acetato de cinamoíla em função da temperatura (a)

Temperatura (°C)	LPS/Amido (%) ^(b)
25	69,3
35	75,2
45	41,2

(a) Tempo: 72h, acetonitrila (b) determinado por RMN-¹H

Observa-se que os resultados obtidos, em geral, são satisfatórios e que estes são dependentes da temperatura utilizada. O maior valor de conversão obtido (75,2%) foi a 35°C, sendo que a 45°C a conversão foi a menor (41,2%). Este resultado pode estar relacionado com a evaporação do solvente ou dos próprios reagentes e provável inativação da LPS, pois de acordo com a ficha técnica a atividade máxima desta lipase, na sua forma livre, é a 50°C.⁴⁵

A partir destes resultados, em estudos subseqüentes, a temperatura de 35°C foi selecionada para efetuar as reações.

4.5.2 - Efeito da imobilização na síntese do acetato de cinamoíla

A seguir, foi determinada a porcentagem de conversão do acetato de cinamoíla na reação de transesterificação do acetato de vinila com o álcool cinâmico, catalisada pela lipase LPS imobilizada ou não, e também na ausência do catalisador. Os resultados obtidos estão mostrados na **Tabela 4**.

Tabela 4 - Efeito da imobilização na conversão em acetato de cinamoíla.^(a)

Sistemas	Conversão (%) ^(b)
LPS/batata	83,3
LPS/livre	64,5
Sem catalisador	0,0

(a) Acetonitrila 25mL; 35° C; 72h; acetato de vinila (5mmol); álcool cinâmico (5mmol); LPS (50mg); (b) determinada por RMN-¹H

Em geral, observa-se que os valores de conversão em acetato de cinamoíla utilizando a lipase LPS imobilizada ou não em filme de amido, foram próximos. A maior foi de 83,3% utilizando a LPS imobilizada, seguido de 64,5% com a lipase na forma livre. Apesar da boa conversão obtida utilizando-se a LPS na sua forma livre, este método não se mostra muito vantajoso, pois a reutilização do biocatalisador pode ser dificultada, aumentando os custos do processo.

A reação feita na ausência do catalisador não formou o produto após 72h, demonstrando que a utilização do mesmo é indispensável para a obtenção do éster. Optou-se então por continuar utilizando a lipase LPS imobilizada em filme de amido, pois este pode ser reutilizado por diversas vezes, e espera-se que a atividade catalítica da enzima mantenha praticamente inalterada, após sucessivas reutilizações.

4.5.3 - Efeito da massa de lipase

Em outro estudo, foi avaliado a influência da massa de LPS imobilizada no filme de amido para a obtenção do acetato de cinamoíla. As conversões em éster em função da massa de lipase estão demonstradas na **Figura 12**.

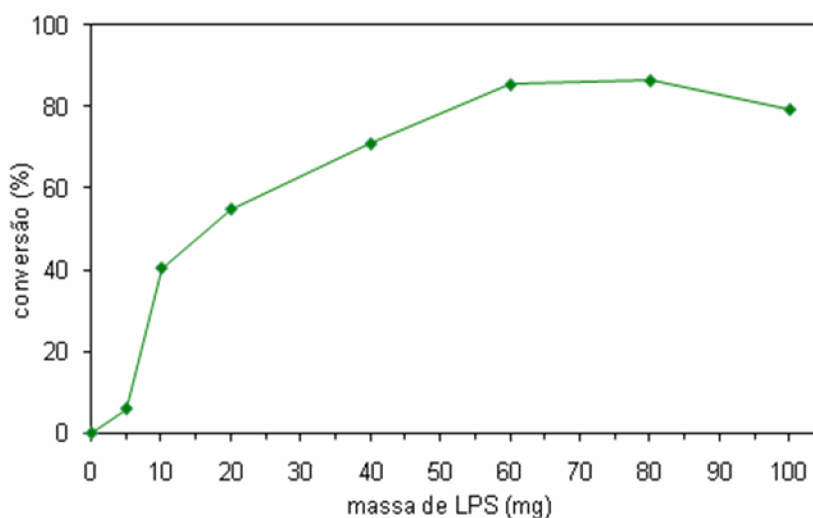


Figura 12 - Conversão em acetato de cinamoíla em função da massa de LPS immobilizada em filmes de amido [acetonitrila, 35°C, 48 h, álcool cinâmico (5mmol), acetato de vinila (5mmol)]

Analisando os dados da **Figura 12**, pode-se observar que os maiores valores de conversão em acetato de cinamoíla, foram obtidos com 60 e 80mg da lipase immobilizada, sendo de 85% e 86% respectivamente. Entre 40 e 100 mg de LPS, as conversões mantiveram-se na mesma faixa (71-86%). A partir desses resultados, a massa de 50mg de lipase foi selecionada para uso nos experimentos seguintes, considerando também o custo.

4.5.4 - Efeito do tamanho da cadeia alquílica na reação de esterificação para obtenção de alcenoatos de cinamoíla

Na reação de esterificação dos ácidos propiônico (C3), hexanóico (C6), cáprico (C10), láurico (C12), mirístico (C14), palmítico (C16) e esteárico (C18) com o álcool cinâmico utilizou-se a lipase *Pseudomonas* sp. LPS (50mg) como catalisador, immobilizada em filme de amido de batata aipo, em CCl_4 , a 35°C, por 72 h. Os resultados obtidos encontram-se na **Figura 13**.

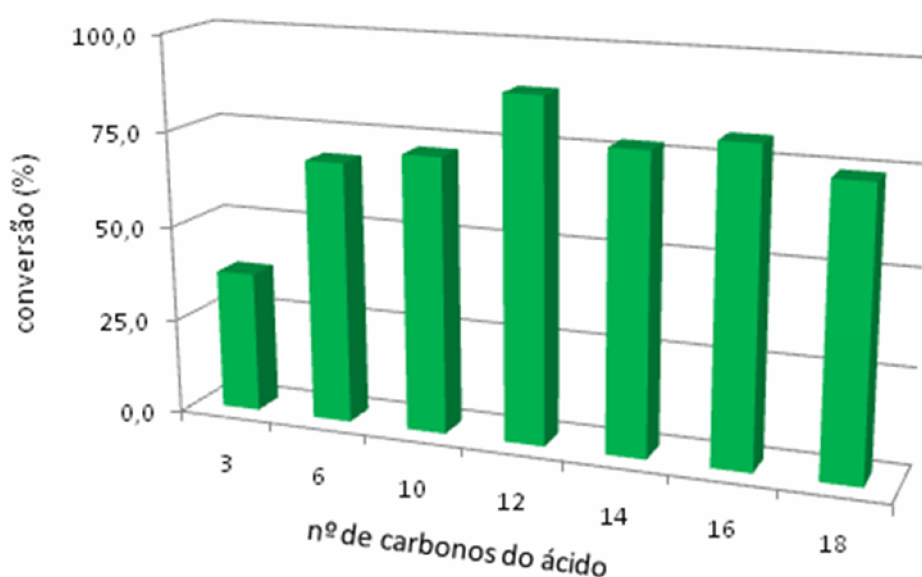


Figura 13 - Conversão em alcenoatos de cinamóila em função do tamanho da cadeia alquílica dos doadores acilas, utilizando o sistema LPS/batata. [LPS 50mg, 35°C, 72h, CCl₄, álcool cinâmico (5mmol), ácido carboxílico (5mmol)]

Ao utilizar o sistema descrito acima como catalisador, as conversões em alcenoatos de cinamóila com os ácidos propiônico, hexanóico, cáprico foram de 37,0%; 68,5%; 72,0%, respectivamente. Com os ácidos láurico, mirístico, palmítico e esteárico as conversões foram de 89,0% , 77,5%, 81,0% e 74,0%, respectivamente.

Estes resultados mostram a dependência do comprimento da cadeia alquílica do ácido na formação do éster. Resultados apresentados por Dalla-Vecchia e *col.* reportaram que as conversões, em éster, utilizando o ácido láurico foram superiores aos demais ácidos carboxílicos alifáticos.²⁴

Yadav e *col.*, estudaram a esterificação do ácido láurico com o álcool cinâmico catalisada pelas lipases de *Candida antarctica* (CAL-B, Novozym 435), *Thermomyces lanuginosus* (Lipozyme RM IM) e *Rhizomucor miehei* (Lipozyme TL IM), em meio não-aquoso. As conversões foram dependentes da procedência e da massa de lipase utilizada, tempo, solvente orgânico e temperatura, sendo de 60-80%.⁴¹

Estes são similares aos obtidos com a LPS imobilizada em filme de amido de batata (89%), com a vantagem de que o filme pode ser reutilizado.

4.5.5 - Reutilização do filme LPS/amido

Após 30 dias de estocagem em CCl_4 , a temperatura ambiente, foi avaliada a reutilização do filme com a LPS para obtenção de alcenoatos de cinamoíla. Os resultados obtidos estão apresentados na **Figura 14**.

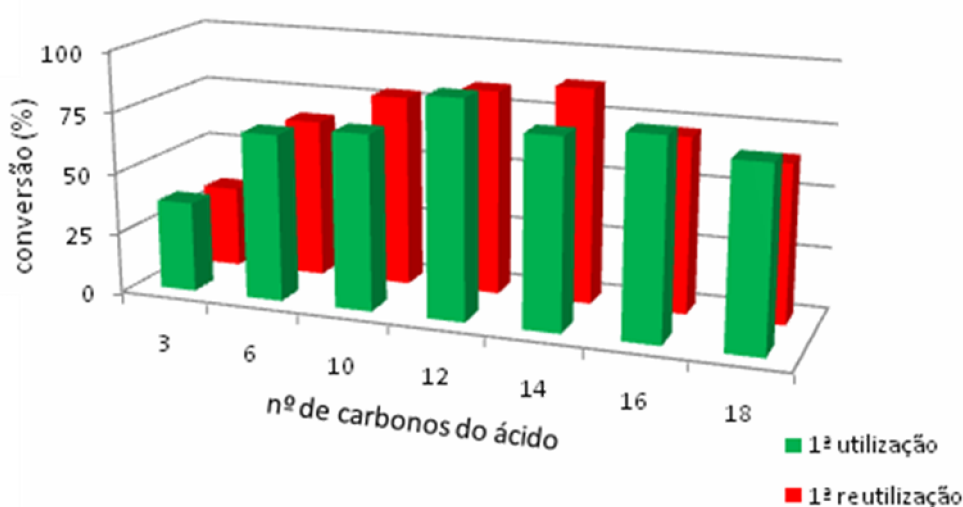


Figura 14 - Conversão em alcenoatos de cinamoíla em função da reutilização dos filmes após 30 dias, utilizando como catalisador o sistema LPS/batata, [CCl_4 , 72h, 35°C, 50mg de LPS, álcool cinâmico (5mmol), ácido carboxílico (5mmol)]

Após a primeira reutilização, pode-se observar que as conversões foram satisfatórias e similares aos da primeira utilização formando os produtos com conversões de 33-87%.

Na reutilização do filme, nas reações com os ácidos cáprico (C10) e mirístico (C14), observou-se um pequeno aumento na conversão em éster. Este resultado pode ser explicado considerando a presença de traços dos substratos oriundos da primeira utilização e que não foram totalmente removidos, mesmo após as sucessivas lavagens do filme com o solvente orgânico.

Os resultados da reutilização demonstraram que a imobilização da LPS no suporte de amido de batata, devido à proteção e manutenção da atividade deste biocatalisador em solventes orgânicos é vantajosa.

4.5.6 - Efeito da influência do solvente orgânico

Solventes orgânicos de diferentes polaridades ($4,0 < \log P > -1,1$) foram usados para avaliar a sua influência na reação de transesterificação do acetato de vinila com o álcool cinâmico, utilizando como catalisador o sistema LPS/batata. A seguir são apresentados os resultados obtidos para a obtenção do acetato de cinamoíla. (Tabela 5).

Tabela 5 - Efeito do solvente orgânico na conversão em acetato de cinamoíla, catalisado pelo sistema LPS/amido de batata.(a)

Solventes	Log P	Conversão (%) ^(b)
tetracloreto de carbono	3,0	75,8
clorofórmio	2,0	39,0
diclorometano	1,5	46,0
t-butanol	1,45	45,0
MTBE ^(c)	1,43	72,4
acetonitrila	-0,33	83,4
1,4-dioxano	-1,1	51,0

(a) Solvente 25mL; 35° C; 72h; acetato de vinila (5mmol); álcool cinâmico (5mmol); LPS (50mg); (b) determinada por RMN-¹H (c) MTBE - éter *t*-butilmetílico.

Na obtenção do acetato de cinamoíla não foi observado uma relação direta da conversão em éster com a polaridade dos solventes (expresso pelo $\log P$), sendo que os maiores valores foram obtidas com MTBE, CCl₄ e acetonitrila, sendo de 72,4; 75,8 e 83,4% respectivamente. Quando a reação foi realizada em 1,4-dioxano, CH₂Cl₂, t-BuOH e CHCl₃ as conversões foram menores sendo de 51; 46; 45 e 39%.

Em outros trabalhos citados na literatura, o uso de solventes menos polares ($\log P > 2$) foram os mais eficientes ^{26,47}, corroborando com a afirmação que solventes hidrofílicos ($\log P < 2$) não são adequados para biocatálise, pois alteram fortemente a interação água/biocatalisador, tornando-o inativo ou ocasionando a desnaturação. ^{5,26}

Entretanto é importante observar que apesar da acetonitrila ser um solvente bastante polar, o acetato de cinamoíla foi obtido em alta conversão. Deve-se considerar também a solubilidade dos substratos, e em particular a do álcool

cinâmico, que é pouco solúvel em solventes de baixa polaridade como o diclorometano e 1,4-dioxano.

4.5.7 - Efeito da imobilização de diversas lipases em filme de amido de batata na obtenção do acetato de cinamoíla

Lipases de diversas procedências foram imobilizadas em filme de amido de batata aipo e posteriormente utilizadas como catalisadores na reação de transesterificação do acetato de vinila com álcool cinâmico. Os resultados obtidos encontram-se na **Tabela 6**.

Tabela 6 - Conversão em acetato de cinamoíla utilizando diferentes lipases (a)

Lipases	Atividade	lipase/batata ^b (%)
LPS	30,000 u/g	75,8
Amano AK 20	25,000 u/g	16,4
PS Amano SD	30,000 u/g	72,4
PS Amano IM	500 u/g	72,3
<i>Candida rugosa</i> (LCR)	746 u/mg	11,0
lipase M (LM)	10,000 u/g	4,0

(a) massa de lipase (50mg), álcool cinâmico (5mmol), acetato de vinila (5mmol), CCl₄, 35°C, 72h

(b) determinado por RMN-¹H

Pode-se observar pelos dados da **Tabela 6** que ao utilizar lipases de procedências diferentes, a conversão em acetato de cinamoíla apresentou resultados de moderados a bons, e que esse fator não deve estar relacionado somente com a diferença na atividade catalítica de cada enzima. As lipases LPS e PS SD têm atividades bem diferenciadas, porém as conversões obtidas em éster utilizando a LPS foram de 75,8% e com a lipase PS SD de 72,3%.

Deve-se considerar também o tamanho da cavidade do sítio ativo e a interação entre a enzima e o suporte, sendo que a imobilização pode alterar a estabilidade e a atividade da enzima, em comparação a sua forma livre.²⁴

Estes dados mostram que a escolha do biocatalisador também é importante em um determinado processo. Para as conversões em acetato de cinamoíla, dentre as diferentes lipases testadas, a maior e menor foram com a LPS e a LM, sendo de 75,8 e 4,0%, respectivamente.

Foram também imobilizadas lipases de outras procedências tais como as LAY, PPL, LA-12 e LF-AP15, porém estas não formaram filmes consistentes e maleáveis, impossibilitando a utilização destes biocatalisadores, na obtenção do éster.

4.5.8 - Efeito da concentração do doador acila

Neste estudo, a quantidade de acetato de vinila utilizada na reação foi de 5mmol a 50mmol e 5mmol de álcool cinâmico, em 25mL de acetonitrila, catalisada por 50mg de LPS imobilizada. Os valores de conversão obtidos em função da variação da concentração de acetato de vinila são demonstrados na **Tabela 7**.

Tabela 7 - Efeito da concentração de acetato de vinila na obtenção do acetato de cinamoíla (a)

Concentração (mmol)	Conversão (%) ^(b)
5	60,0
20	85,5
35	>99
50	>99

(a) acetonitrila 25mL; 35° C; 48h; álcool cinâmico (5mmol); LPS (50mg); (b) determinada por RMN-¹H

Aumentando a concentração de acetato de vinila, os valores de conversão em acetato de cinamoíla também aumentaram, atingindo valores acima de 99% com 35 mmol e de 50mmol. Estes dados evidenciam que as conversões podem ser maximizadas a partir de alterações simples nas proporções do álcool e do agente acilante em reações de transesterificação. Singh e *col.*, também avaliaram a influência da concentração do acetato de vinila na reação com o álcool benzílico, mostrando que proporções maiores do doador acila aumentam as conversões em éster.⁴⁸

4.5.9 - Efeito da imobilização simultânea de duas lipases

Quando dois ou mais biocatalisadores são usados simultaneamente na forma livre ou imobilizados no mesmo suporte, emprega-se o termo “coquetel enzimático” ou “sistema multienzimático”.⁴⁹

As lipases LPS e LAK 20 foram imobilizadas simultaneamente em quantidades variáveis em filme de amido, para avaliar se havia ou não um efeito aditivo. Estes sistemas foram usados como catalisadores na reação de transesterificação do acetato de vinila com álcool cinâmico. Cada sistema foi preparado mantendo-se constante a massa total (50 mg), em diferentes proporções das duas lipases (1:4; 2:3; 3:2; 4:1).

Os resultados de conversão em éster estão apresentados na **Tabela 8**.

Tabela 8 Efeito da utilização do “coquetel enzimático” LPS/LAK na conversão em acetato de cinamoíla (a)

Sistemas (mg/mg)	Conversão (%) ^(b)
LAK (50)	16,4
LPS /LAK (10/40)	9,0
LPS /LAK (20/30)	26,4
LPS /LAK (30/20)	37,8
LPS /LAK (40/10)	40,1
LPS (50)	75,8

(a) acetonitrila 25mL; 35° C; 48h; acetato de vinila (5mmol); álcool cinâmico (5mmol); lipases (50mg); (b) determinada por RMN-¹H

As conversões em éster foram de 9-40%, e pode-se observar que com a imobilização simultânea destas lipases não houve variação significativa na formação do produto. Ao analisar as conversões utilizando as duas lipases imobilizadas, observou-se uma diminuição na formação do acetato de cinamoíla em relação ao uso de cada uma das lipases, antes da mistura. Estes foram de 75,8% e 16,4%, com a LPS e LAK, respectivamente.

Realizou-se um estudo semelhante do efeito do “coquetel enzimático”, porém utilizando as lipases de *Pseudomonas* sp. – LPS e de *C. rugosa* – LCR (LPS/LCR). Os resultados são demonstrados a seguir na **Tabela 9**.

Tabela 9 - Efeito da utilização do “coquetel enzimático” LPS/LCR na conversão em acetato de cinamoíla (a)

Sistemas (mg/mg)	Conversão (%) ^(b)
LCR (50)	11,3
LPS /LCR (10/40)	48,2
LPS /LCR (20/30)	39,2
LPS /LCR (30/20)	38,6
LPS /LCR (40/10)	46,2
LPS (50)	75,8

(a) acetonitrila 25mL; 35° C; 48h; acetato de vinila (5mmol); álcool cinâmico (5mmol); lipases (50mg); (b) determinada por RMN-¹H

Ao utilizar as duas enzimas em diferentes proporções, as conversões em acetato de cinamoíla variaram entre 38,6-48,2%, mostrando novamente que a imobilização simultânea destas lipases não proporcionou uma variação significativa na formação do produto, em comparação com a LPS. Porém estes são maiores que os obtidos ao usar a LCR pura (11,3%), sendo vantajoso utilizar a LCR com a LPS no mesmo suporte.

Embora estes dados não sejam muito satisfatórios, não é excludente que a imobilização simultânea de lipases de outras procedências e em diferentes suportes possa conduzir a resultados mais relevantes em termos de formação do produto.

4.5.10 - Análises espectroscópicas de IV e RMN-¹H do acetato de cinamoíla

O acetato de cinamoíla obtido nas reações de transesterificação do acetato de vinila com o álcool cinâmico, foi caracterizado por técnicas de ressonância magnética de hidrogênio (RMN-¹H) e de infra-vermelho (IV).

A **Figura 15** mostra o espectro de RMN-¹H e a **Figura 16** o espectro de IV do acetato de cinamoíla.

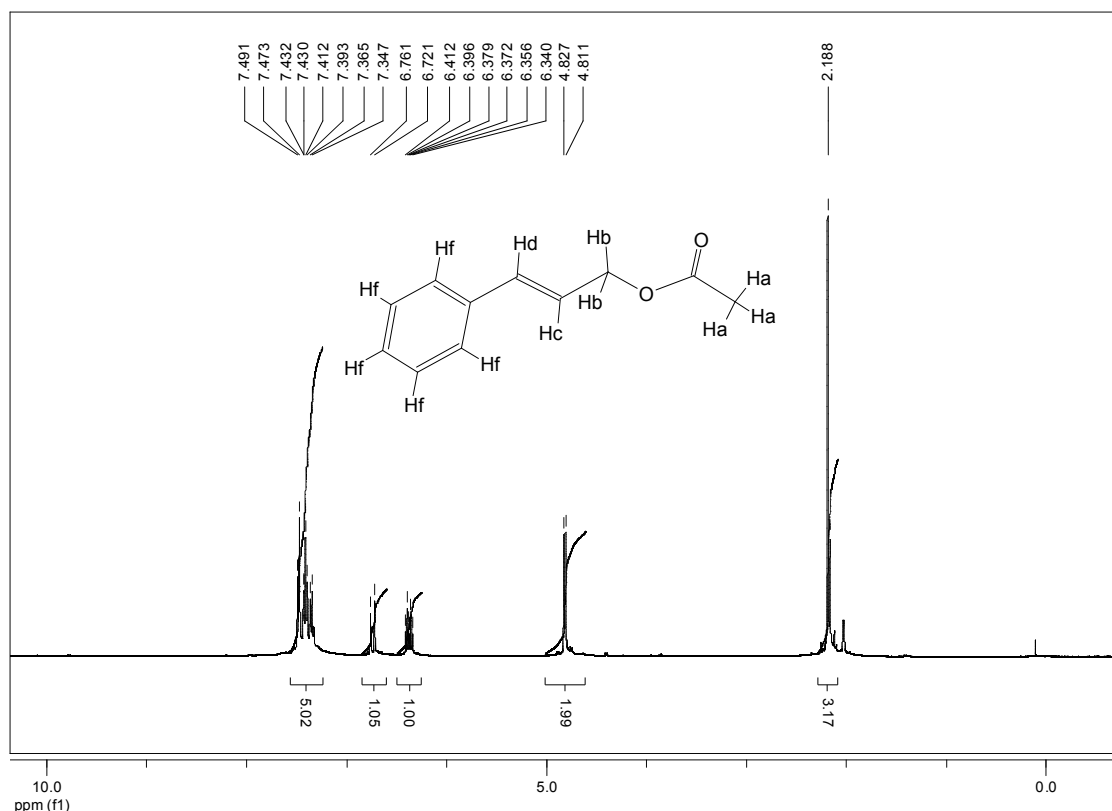


Figura 15 - Espectro de RMN- ^1H do acetato de cinamoíla. (400MHz, CDCl_3)

No espectro de RMN- ^1H , são observados um multiplete em 7,34 – 7,49 ppm referentes aos hidrogênios do anel aromático (5H_f), um dublete centrado em 6,74 ppm referente ao hidrogênio d (1H_d), um multiplete de 6,34 – 6,41 ppm referente ao hidrogênio c (1H_c), e um dublete centrado em 4,81 ppm referente aos hidrogênios mais próximos a carbonila (2H_b). É também observado um singlete dos hidrogênios da metila (3H_a) centrado em 2,18 ppm.

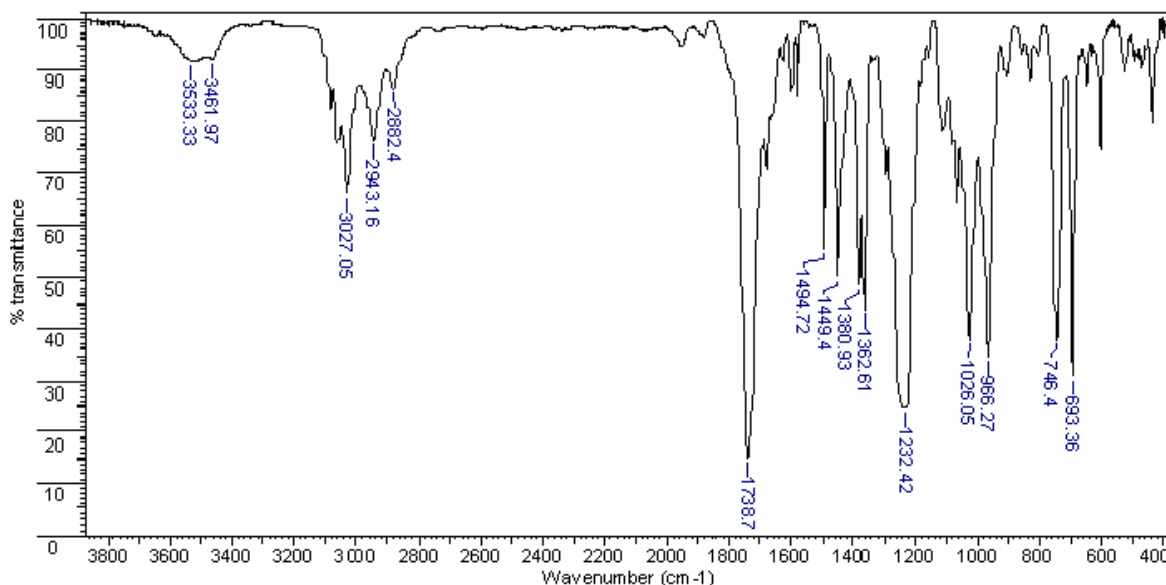


Figura 16 - Espectro de IV do acetato de cinamoíla. (Nujol)

Através da análise da **Figura 16**, observam-se as bandas características do acetato de cinamoíla, que comparado com um espectro da literatura, apresentou valores semelhantes para as principais bandas características do composto.

Na região de 1738 cm^{-1} (1738 cm^{-1})⁵⁰, observa-se o estiramento da carbonila do éster (C=O), e em 1232 cm^{-1} (1232 cm^{-1})⁵⁰ é observado o estiramento da ligação C-O também relativa ao éster. Outras bandas características são as de deformação angular fora do plano, das ligações C-H presente no anel aromático com valores de 746 e 693 cm^{-1} (746 e 693 cm^{-1})⁵⁰. Nota-se ainda uma pequena banda em torno de 3500 cm^{-1} , com formato arredondado, que é característica de grupamentos OH, indicando a presença do álcool de origem (cinâmico) ou até mesmo água oriunda de solventes utilizados.

5 – CONCLUSÕES

As principais conclusões deste trabalho são:

- A extração do amido proveniente do tubérculo de batata aipo mostrou-se viável, obtendo-se 117,5g de amido a partir de 1Kg de tuberculo, após a secagem.
- A quantidade de água nos filmes com e sem LPS variou de 2,43-3,26%, e contribuindo para a manutenção da atividade catalítica da enzima.
- O filme de amido de batata mostrou-se estável em solventes orgânicos e em elevadas temperaturas.
- A obtenção do acetato de cinamoíla apresentou as melhores conversões com a utilização da LPS imobilizada, sendo de 83,3%.
- As reações de obtenção dos alcenoatos cinamoíla foram dependentes do tempo, temperatura, solvente orgânico utilizado e do tamanho da cadeia alquílica do ácido carboxílico.
- As maiores conversões em acetato de cinamoíla foram obtidas com 60 e 80mg de LPS imobilizada, sendo de 85 e 86%, respectivamente.
- Utilizando o sistema LPS/amido as maiores e menores conversões, em 72h, foram obtidas para o laurato e propionato de cinamoíla, sendo de 89,0 – 37,0%, respectivamente.
- A reutilização dos filmes após 30 dias de estocagem se mostrou vantajosa, mantendo conversões similares à primeira utilização (33,3 – 87,8%).
- A obtenção do acetato de cinamoíla apresentou maiores conversões quando realizado a 35°C, sendo de 75,2%, enquanto a 25 e 45°C estas foram de 69,3 e 41,2%, respectivamente.
- Utilizando solventes de diferentes polaridades, com o sistema LPS/amido obteve-se conversões em alcenoatos de cinamoíla de 75,4% em CCl₄ e de 83,3% em acetonitrila.
- Com as lipases LPS, PS SD e PS IM obteve-se as maiores conversões em acetato de cinamoíla, sendo de 75,8; 72,3 e 72,4%, respectivamente.

- Com a imobilização simultânea de duas lipases (LPS e LAK 20) ou (LPS e LCR) os resultados foram moderados, variando de 9 - 40% e 38 – 48%, respectivamente.
- Com a utilização de concentrações maiores do doador acila na reação de transesterificação do acetato de vinila com o álcool cinâmico as conversões foram >99%.

Portanto, a utilização de filme de amido como suporte para imobilização de lipases mostrou-se ser extremamente vantajosa. O amido por ser encontrado em abundância nos vegetais, é um material barato, além de ser biodegradável, não prejudicando assim o meio ambiente.

6 – PERSPECTIVAS

- Continuar com os estudos da imobilização simultânea de duas ou mais lipases no mesmo suporte.
- Utilizar as lipases imobilizadas para efetuar reações de resolução de racematos (por ex. D,L mentol)
- Avaliar a influência do tempo, reutilização do sistema nas reações de transesterificação e esterificação do álcool cinâmico com diferentes doadores acila (por ex. acetato de *iso*-propenila, anidrido acético e acetato de etila)
- Utilizar diferentes proporções de glicerol/solvente orgânico para avaliar a contribuição desta mistura nas conversões em alcenoatos de cinamoíla.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Oliveira, G., L., Mantovani M., S., *Quim. Nova*, 32 (3), 742-756, **2009**.
- 2- Murray, R. K.; Granner, D. K.; Harper; *Bioquímica*, 6ª Ed., Cap. 7, Atheneus, SP, **1990**.
- 3- Campbell, M.K.; *Biochemistry*, 3ª Ed., Saunders College Publication, **1999**.
- 4- Palmer, T. *Understanding Enzymes*, Prentice Hall-Ellis Horwood, 67-75, **1995**.
- 5- Faber, K.; *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer-Verlag, New York, **1997**.
- 6- Voet, D.; Voet, J.G., Pratt, C. W.; *Fundamentos de Bioquímica*. Ed. Artmed, Porto Alegre, **2000**.
- 7- Wong, C.; Whitesides M.; *Enzymes in Synthetic Organic Chemistry*, Pergamon, v.12, cap 1-2, p. 1-130, **1994**.
- 8- Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Lehninger: Principles of Biochemistry*, 3rd Ed., Worth Publishers, Cap.5, 113-290, **2000**.
- 9- Carvalho, O. P.; Calafatti, S.A.; Marassi, M.; Da Silva, D. M.; Contesini, F. J.; Bizaco, R. *Quim. Nova*, 28, 4, 614-621, **2005**.
- 10- Haki, G.D.; Rakshit, S.K.; *Biores. Technol.* 89, 17-34, **2003**.
- 11- Sharma, R.; Chisti, Y.; Barnejee, U.C. *Biotechnol. Adv.* 19, 627-662, **2001**.
- 12- Roberts, S.M., *Biocatalysis for Fine Chemical Synthesis*, John Wiley & Sons, Ltda England, **1999**.
- 13- Dalla-Vecchia R.; Nascimento M. G.; Soldi V.; *Quim. Nova*; 27, 4, 623-630, **2004**.
- 14- Gotor-Fernández, V.; Brieva, R.; Gotor, V. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 40, 111-120, **2006**.
- 15- Nascimento, M. G.; Neto, P. R. C.; Mazucco, L. M. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, ano III, 19, 28-31, **2001**.
- 16- De Castro, H. F.; Mendes. A. A.; dos Santos, J. C.; de Aguiar, C. L. *Quim. Nova*, 27 (1), 146 –156, **2004**.
- 17- Hasan, F.; Shah, A. A.; Hameed, A. *Enzym. Microb. Technol.* 39, 235-251, **2006**.
- 18- Dabdoub M. J.; Bronzel J. L. *Quim. Nova*. 32, 776-792, **2009**.
- 19- Singh M.; Singh R. S.; Banerjee C. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 56, 294-299, **2009**.
- 20- Ghanem, A., *Tetrahedron Lett.*; 63, 1721-1754; **2007**.
- 21- Dandavate, V.; Keharia, H.; Mandamwar, D. ; *Process Biochem.* 44, 349-352, **2009**.

- 22- Huang, X.; Yu, A.; Jiang, J.; Pan, C.; Qian, J.; Xu, Z.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* , 57, 250-256, **2009**.
- 23- Pirozzi, D.; Fanelli, E.; Aronne, A. Pernice, P.; Mingione, A.; *J. Mol. Catal. B : Enzym.* , 59, 116-120, **2009**.
- 24- Dalla-Vecchia, R.; Sebrão, D.; Soldi, V.; Nascimento, M. G. *Process Biochem.* 40, 2677-2682, **2005**.
- 25- Ye, P.; Jiang, J.; Xu, Z. *Colloids Surf. B*, 60, 62–67, **2007**.
- 26- Sebrão, D; Silva, V. D; Nascimento, M. G.; Moreira, M. A. *Quím. Nova*, 30, 5, 1182-1187, **2007**.
- 27- Clark, A. H.; Ross-Murphy, S. B.; *Adv. Polymer Sci.* 83, 107-115, **1987**.
- 28- Bobbio, F.; Bobbio, P.; *Introdução a Química de Alimentos*, 56-61, **1985**.
- 29- De Oliveira, F.; Akisue, G.; *Fundamentos de Farmacobotânica*, 2º Ed., cap 6, 28-32, Atheneus, **2000**.
- 30- http://www.exportes.org.br/exportes/imagem_produtos/548_100px.jpg, acessada em 06 de novembro **2009**.
- 31- <http://www.byebiegordura.com.br/fotos/inhame.jpg>, acessada em 06/11/2009.
- 32- <http://ibahia.globo.com/bahiarural/interna.asp?modulo=2269&codigo=122803>, acessada em 06 novembro de **2009**.
- 33- <http://www.folhadonorte.com.br/site/ver.php?manchete=458>, acessada em 06 de novembro de **2009**.
- 34- http://www.hortifruti.com.br/cgi-bin/t_vidaleve.asp?area=produtosdaestacao&id=9, acessada em 07 de novembro de **2009**.
- 35- <http://www.scielo.br/img/revistas/po/v15n4/a11fig01.gif>, acessada em 07 de novembro de **2009**.
- 36- <http://ronaldorossi.com.br/blog/wp-content/uploads/2008/12/mandioquinha.jpg> acessado em 07 de novembro de **2009**.
- 37- <http://www.abam.com.br/revista/revista7/riquezas.php>, acessada em 3 de novembro **2009**.
- 38- <http://www.abam.com.br/revista/revista14/biopolicimeros.php> acessada em 3 novembro de **2009**.
- 39- http://www.abam.com.br/includes/menu1/consultas_tecnicas/Volume_1/CAP2.pdf acessada em 3 de novembro de **2009**.
- 40- Bezbradica, D.; Mijin, D.; Siler-Marinkovic, S.; Knezevic, Z.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* , 45, 97-101, **2007**.

- 41- Yadav, D. G.; Dhoot, B. S.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 57, 34-39, **2009**.
- 42- Fehér, E.; Illeová, V.; Kelemen-Horváth, I.; Bélafi-Bakó, K.; Polakovic, M.; Gubicza, L.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 50, 28-32, **2008**.
- 43- Simas, K. N.; Lima, da C. E.; Conceição, da R. S.; Kuster, M. R.; Filho, de O. M. A.; Lage, S. L. C.; *Quim. Nova*, 27(1), 46-49, **2004**.
- 44- Ozyilmaz G.; Gezer E. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* doi:10.1016/j.molcatb.2009.04.013, **2009**.
- 45- a - www.amano.com, Ficha técnica da lipase *Pseudomonas* sp., acessada em 3 de novembro de 2009; b – Catálogo da Sigma, pg 639, **1999**.
- 46- Rocha T. S., Demiate I. M., Franco C. M. L. ; *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 28(3), 620-628, **2008**
- 47- Hoffmann I.; Trabalho de Conclusão de Curso, Departamento de Química, UFSC, **2007**.
- 48- Singh M.; Sawraj S.; Singh R. S.; Chisti Y.; Banerjee U. C.; *Biores. Technol.* 99, 2116-2120, **2008**.
- 49- Polizzi, k.M.; Bommarius, A.S.; Broering, J.M.; Chaparro-Riggers, J.F.; *Curr.Opin.Chem.Biol.*11, 220-225, **2007**.
- 50- http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi acessado em 07/11/2009.